

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2005年9月1日 (01.09.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/080600 A1

(51)国際特許分類⁷:
C12M 1/00, C12N 15/00, B09C 1/10

C12Q 1/68,

(74)代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒5306026 大阪府大阪市北区天満橋 1丁目 8番30号 OAPタワー26階 Osaka (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2005/003175

(22)国際出願日: 2005年2月25日 (25.02.2005)

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2004-050082 2004年2月25日 (25.02.2004) JP
特願2004-050083 2004年2月25日 (25.02.2004) JP

(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- すべての指定国のために先の出願に基づく優先権を主張する出願人の資格に関する申立て(規則4.17(iii))
- すべての指定国のために先の出願に基づく優先権を主張する出願人の資格に関する申立て(規則4.17(iii))

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき國際事務局から入手可能

/ 続葉有 /

(54) Title: METHOD OF JUDGING BIOLOGICAL ACTIVITY IN BIOREMEDIATION SITE AND POLYNUCLEOTIDE FOR DETECTING MICROORGANISM TO BE USED THEREIN

(54)発明の名称: バイオレメディエーションサイトの生物活性判定方法及びそれに用いる微生物検出用ポリヌクレオチド

(57) Abstract: It is intended to provide a method whereby the ability of a microorganism occurring in an environment contaminated with tetrachloroethylene (PCE) or trichloroethylene (TCE) to degrading a contaminant can be quickly judged. A method of judging a biological activity which comprises detecting a bacterium in a contaminated environment having an activity of degrading an organochlorine compound and/or a dechlorinated product thereof by using a DNA enabling the detection of such a bacterium specifically and thus judging the ability of the environment to remove the organochlorine compound. It is also intended to provide a novel polynucleotide which is usable as the DNA probe in the above method of judging a biological activity.

(57)要約: テトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) による汚染環境中に存在する微生物の汚染物質分解能力を迅速に判定できる方法の提供を目的とする。前記目的を達成するために、本発明の生物活性判定方法は、有機塩素化合物及び/又はその脱塩素化合物の分解活性を有するバクテリアを特異的に検出できるDNAプローブを用いて、汚染環境中のバクテリアを検出し、前記環境の有機塩素化合物の除去能力を判定する方法である。本発明は、また、本発明の生物活性方法にDNAプローブとして利用できる新規なポリヌクレオチドを提供する。

WO 2005/080600 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

バイオレメディエーションサイトの生物活性判定方法及びそれに用いる微生物検出用ポリヌクレオチド

技術分野

[0001] 本発明は、バイオレメディエーションサイトの生物活性判定方法及びそれに用いる微生物検出用ポリヌクレオチドに関する。

背景技術

[0002] テトラクロロエチレン(PCE)及びトリクロロエチレン(TCE)をはじめ、各種の有機塩素化合物による地下水や土壤の汚染は、世界共通の深刻な問題であり、しばしば、新聞紙上等のマスコミでも詳細に取り上げられ、これらの物質による環境汚染を修復するための技術開発が社会的に強く要求されている。

[0003] 汚染環境修復技術として、物理化学的方法と生物的方法とがあげられるが、低濃度汚染の修復には、微生物を用いる生物的環境修復方法(バイオレメディエーション)が特に適している。バイオレメディエーションは、土壤の掘削が必要なく、建造物下の環境修復も容易であること、低コストで環境負荷が少ないとから、その実用化への期待が大きい。

[0004] バイオレメディエーションの方式には、汚染された土壤や地下水に元来生息する微生物に、例えば、各種栄養物質等を供給し、微生物の持つ環境汚染物質の分解除去能力を増強させる方式(バイオスティミュレーション)と、環境汚染物質を分解除去する能力を持つ微生物を汚染環境に直接導入する方式(バイオオーギュメンテーション:例えば、特開2003-154332号公報)とがある。TCEに汚染された地下水の環境修復を、バイオスティミュレーションとバイオオーギュメンテーションにより行い、優れた成果をあげた例もある。

[0005] バイオレメディエーションを適用するにあたり、その汚染サイトがバイオスティミュレーション可能か、あるいは、系外から汚染物質分解能力を持つ微生物を導入するバイオオーギュメンテーションを適用しなければならないかの判定を迅速に行うことが望まれている(例えば、特開2000-079000号公報)。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] そこで、本発明は、テトラクロロエチレン(PCE)やトリクロロエチレン(TCE)により汚染された環境中の微生物を検出し、前記環境の汚染物質分解能力(生物活性)を迅速に判定できる方法、及び、前記判定方法に用いる微生物検出用ポリヌクレオチドの提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 前記目的を達成するために、本発明の環境の生物活性判定方法は、PCE及びTC Eの少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境の生物活性判定方法であつて、環境試料から抽出した核酸を遺伝子増幅方法により増幅してターゲットとし、前記ターゲットを前記有機塩素化合物の分解関連バクテリアに特有の塩基配列を含むDNAプローブとハイブリダイズさせることで前記環境中の前記バクテリアを検出し、検出された前記バクテリアの前記有機塩素化合物及びその脱塩素化物に対する分解能力に基づき、前記環境の前記有機塩素化合物の除去能力を判定する生物活性判定方法である。

ここで、前記DNAプローブは、本発明のポリヌクレオチドである下記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブを1つ又は2つ以上含む。

(1)配列番号1～17及び配列番号19～105のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(2)前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであつて、前記(1)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3)前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであつて、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(4)前記(1)～(3)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

また、本発明における検出対象の有機塩素化合物分解関連バクテリアは、下記AからRからなる群から選択される1種又は2種以上の嫌気性バクテリアを含む。

- A:デハロスピリルム マルチヴォボランス (Dehalospirillum multivorans)
- B:デスルフィトバクテリウム フラピエリ (Desulfitobacterium frappieri)
- C:アクチノマイセタレス Sm-1 (ロドコッカス sp. Sm-1)
(Actinomycetales Sm-1 (Rhodococcus sp. Sm-1))
- D:ロドコッカス ロドコッカス (Rhodococcus rhodococcus)
- E:キサントバクター フラバス (Xanthobacter flavus)
- F:マイコバクテリウム L1 (Mycobacterium L1)
- G:デスルフォミクロビウム ノルベギカム(デスルフォヴィブリオ バキュラタス)
(Desulfomicrobium norvegicum (Desulfovibrio baculatus))
- H:デスルフィトバクテリウム デハログナンス (Desulfitobacterium dehalogenans)
- I:デスルフィトバクテリウム ハフニエンス (Desulfitobacterium hafniense)
- J:クロストリジウム フォルミコアセチカム (Clostridium formicoaceticum)
- K:デスルフロノナス クロロエテニカ (Desulfuromonas chloroethenica)
- L:アセトバクテリウム ウッディ DSM 1030
(Acetobacterium woodii DSM 1030)
- M:デハロバクター レストリクタス (Dehalobacter restrictus)
- N:デスルフィトバクテリウム sp. PCE1
(Desulfitobacterium sp. strain PCE1)
- O:デスルフィトバクテリウム フラピエリ TCE1
(Desulfitobacterium frappieri TCE1)
- P:アセトバクテリウム ウッディ DSM 2396
(Acetobacterium woodii DSM 2396)
- Q:デスルフォモニル タイドジェイ DCB-1 (Desulfomonile tiedjei DCB-1)
- R:デハロコッコイデス エタノジエネス195 (Dehalococcoides ethenogenes 195)

発明の効果

[0008] 本発明者らは、PCEやTCE等の有機塩素化合物による汚染環境のバイオレメディ

エーションに関して、汚染環境中から有機塩素化合物及びその脱塩素化物を分解できる嫌気性バクテリアを迅速に検出できれば、バイオスティミュレーションが可能か、又は、バイオオーギュメンテーションが必要かの判断が容易になることに着目した。そして、現在知られている18種類の有機塩素化合物及びその脱塩素化物を分解できる嫌気性バクテリア(前記A～Rのバクテリア。以下、嫌気性有機塩素化合物分解関連バクテリアともいう。)の検出方法について、鋭意研究を重ねた。

[0009] その結果、前記A～Rのバクテリアに共通するゲノムの領域であるITS領域の塩基配列(配列番号1～18)が、それぞれのバクテリアで特異性があり、この塩基配列に基づくポリヌクレオチドを含むDNAプローブを用いれば、前記A～Rのバクテリアを、例えば、DNAマイクロアレイ等の遺伝子検出技術を用いて検出できることを見出した。

[0010] さらに、本発明者らは、研究を重ね、18種類の前記A～RのバクテリアのそれぞれのITS領域の塩基配列(配列番号1～18)から、例えば、DNAマイクロアレイ等に好ましく使用できる長さであって、互いに交差反応することなく前記A～Rのバクテリアを同時に検出できる特異的な塩基配列(配列番号19～115)を特定し、本発明に到達した。

[0011] 前記ITS領域とは、バクテリアゲノムの16SリボソーマルDNAと23SリボソーマルDNAとの間の転写を受ける領域(Internal Transcribed Spacer)のことである。なお、前記A～QのバクテリアのITS領域の塩基配列(それぞれ、配列番号1～17)は、本発明者らにより初めて決定された配列である。

[0012] 本発明は、汚染環境中の有機塩素化合物分解関連バクテリアを、DNAプローブを用いて迅速に検出し、前記バクテリアの分解能力(例えば、図5B参照)に基づき、前記環境のPCE及びその脱塩素化物の除去能力を判定できる。したがって、本発明によれば、バイオレメディエーションにおいて、バイオスティミュレーションが可能か、又は、バイオオーギュメンテーションが必要かの判断が容易になり、適切な環境修復方法の選択が可能となる。さらに、環境修復方法を迅速、適切に選択することで、環境修復を安価なものとすることが可能となる。

[0013] PCEの分解は、好気性条件では困難であると考えられている。また、通常、地表よ

り50cm以下は嫌気性であると考えられている。したがって、PCEの汚染環境や、地表50cm以下の汚染環境を、本来利用可能な嫌気性微生物ではなく好気性微生物で修復することは、余分なコストやエネルギーの投入となる場合もある。本発明によれば、このような余分なコストやエネルギーの使用を回避することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、実施例1におけるDNAマイクロアレイによる検出結果を示す図である。
[図2A]図2Aは、実施例2におけるDNAマイクロアレイのスキャン結果を示す写真である。
[図2B]図2Bは、実施例2におけるDNAマイクロアレイを用いたバクテリアMの検出結果を示すグラフである。
[図3A]図3Aは、実施例3におけるDNAマイクロアレイのスキャン結果を示す写真である。
[図3B]図3Bは、実施例3におけるDNAマイクロアレイを用いたバクテリアJの検出結果を示すグラフである。
[図4]図4は、実施例4におけるバクテリアA、B、I、J、M、N及びOを検出したDNAマイクロアレイのスキャン結果を示す写真である。
[図5A]図5Aは、PCEの分解経路を説明する図である。
[図5B]図5Bは、バクテリアA～Rの有機塩素化合物に対する分解活性を説明する図である。

発明を実施するための最良の形態

[0015] 本発明の生物活性判定方法において検出対象とするバクテリアは、有機塩素化合物分解関連バクテリアであって、現在、PCEからエテン又は二酸化炭素への分解に関与すると知られている前記A～Rの18種類のバクテリアを1種類又は2種類以上含む。また、有機塩素化合物分解関連バクテリアとしては、これらに限られず、今後PCEの分解に関連するとして明らかになるバクテリアを含むものである。

[0016] 前記AからQのバクテリアは、以下に示す生物資源保存機関であるATCC又はDSMZの寄託番号が付されており、該当機関から入手することができる。

A:DSM 12446 B:DSM 13498 C:ATCC 51239

D:ATCC 21197 E:DSM 10330 F:DSM 6695
G:DSM 1741 H:DSM 9161 I:DSM 10644
J:ATCC 27076 K:DSM 12431 L:DSM 1030
M:DSM 9455 N:DSM 10344 O:DSM 12704
P:DSM 2396 Q:ATCC 49306

[0017] PCEは、脱塩素化され、TCE、ジクロロエチレン(DCE)、ビニルクロライド(VC)となり、最終的に、エテン又は二酸化炭素に分解される。図5Aに、一般的なPCEの分解経路を示す。前記A～RのバクテリアのPCE及び脱塩素化物に対する分解活性は、既に知られており、各バクテリアの生物活性を図5Bに示す。したがって、環境中に、前記A～Rのバクテリアの少なくとも一種類を検出できれば、その環境が、検出されたバクテリアの分解活性に対応した生物活性を備えていると判定することができる。

[0018] 具体的には、例えば、環境中に、前記J、L及びPの少なくとも1種のバクテリアが検出された場合は、前記環境が、PCEをTCEに分解する生物活性を有すると判定でき、前記A、G及びMの少なくとも1種のバクテリアが検出された場合は、PCEをシス型ジクロロエチレン(cisDCE)に分解する生物活性を有すると判定でき、前記B、I、H、N、O及びQの少なくとも1種のバクテリアが検出された場合は、PCE及びTCEをcis DCEに分解する生物活性を有すると判定でき、前記バクテリアKが検出された場合は、PCE及びTCEをDCEに分解する生物活性を有すると判定でき、前記バクテリアRが検出された場合は、PCE、TCE、DCE及びVCをエテンに分解する生物活性を有すると判定でき、前記C、D及びEの少なくとも1種のバクテリアが検出された場合は、DCE及びVCを二酸化炭素に分解する生物活性を有すると判定でき、前記バクテリアFが検出された場合は、VCを二酸化炭素に分解する生物活性を有すると判定できる。また、異なる分解活性を有するバクテリアが2種類以上検出された場合には、前記環境が、それぞれの分解活性を組合せた生物活性を有すると判定できる。

[0019] 本発明の生物活性判定方法におけるバクテリアの検出方法は、環境試料から核酸を抽出し、遺伝子增幅方法によって、ターゲットを作製する工程と、検出対象バクテリアに特異的なDNAプローブに前記ターゲットをハイブリダイズさせる工程とを含む。

[0020] 本発明において、前記DNAプローブは、検出対象バクテリアのITS領域に由来す

る。すなわち、配列番号1～18の塩基配列の全部又はその一部を含むポリヌクレオチドを、本発明におけるDNAプローブとして使用できる。

[0021] 原核生物のリボゾームRNA(rRNA)である16SrRNA、23SrRNA及び5SrRNAは、通常、1つの転写単位(オペロン)として転写されるため、16SrRNA遺伝子と23SrRNA遺伝子は隣り合ってゲノム上に配置されている。この16SrRNA遺伝子と23SrRNA遺伝子との間の領域が、16S-23S Internal Transcribed Spacer(ITS)と呼ばれる領域である。

[0022] 本発明者らは、前記A～Qのバクテリアにおける前記ITS領域の塩基配列(それぞれ、配列番号1から17)を決定し、このITS領域のポリヌクレオチドであれば、前記AからQのバクテリアに特有のDNAプローブが作製できることを初めて見出した。なお、前記バクテリアRのゲノム塩基配列は、コーネル大のDr. Zinder氏により配列決定されたものである。前記バクテリアRのITS領域の塩基配列(配列番号18)も、前記バクテリアRに特異的であるため、前記バクテリアRのITS領域に由来するDNAプローブと、前記17種のA～QのバクテリアのITS領域に由来するDNAプローブとを併用すれば、前記AからRの18種全てのバクテリアを検出できる一組のDNAプローブとすることができる。

[0023] 前記A～Rのバクテリアを検出するDNAプローブとしては、前記ITS配列全体よりもその一部の塩基配列からなるものが好ましい。DNAプローブは、通常、その長さが短くなるほど配列特異性が増し、信頼度が向上するからである。一方、配列自体が前記バクテリアそれぞれに対して特有である必要がある。DNAプローブの長さとしては、特に制限されないが、例えば、10塩基から前記ITS配列全体であり、40～80塩基が好ましい。

[0024] 前記A～Rのバクテリアを検出するDNAプローブとして使用できるITS領域由來の長さ40塩基のポリヌクレオチドの具体例が、配列番号19～115の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0025] すなわち、前記バクテリアAを検出するDNAプローブとして、配列番号19～25の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアBを検出するDNAプローブとして、配列番号26～30の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記

バクテリアCを検出するDNAプローブとして、配列番号31～35の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアDを検出するDNAプローブとして、配列番号36～40の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアEを検出するDNAプローブとして、配列番号41～45の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアFを検出するDNAプローブとして、配列番号46～48の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアGを検出するDNAプローブとして、配列番号49～53の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアHを検出するDNAプローブとして、配列番号54～57の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアIを検出するDNAプローブとして、配列番号58～62の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアJを検出するDNAプローブとして、配列番号63～68の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアKを検出するDNAプローブとして、配列番号69～74の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアLを検出するDNAプローブとして、配列番号75～79の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアMを検出するDNAプローブとして、配列番号80～86の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアNを検出するDNAプローブとして、配列番号87～91の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアOを検出するDNAプローブとして、配列番号92～96の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアPを検出するDNAプローブとして、配列番号97～99の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアQを検出するためのDNAプローブとして、配列番号100～105の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用でき、前記バクテリアRを検出するためのDNAプローブとして、配列番号106～115の塩基配列を含むポリヌクレオチドが使用できる。

[0026] 上述した配列番号1～115の塩基配列からなるポリヌクレオチドは、1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであっても、本発明の生物活性判定方法のためのDNAプローブとして使用できる。すなわち、本発明のDNAプローブは、下記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むプローブである。

(1)配列番号1～115のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(2)前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3)前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(4)前記(1)～(3)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

[0027] ここで、欠失、置換もしくは付加が可能な塩基数としては、例えば、40塩基に対して、欠失・付加で、1個～6個であり、1個～3個が好ましく、より好ましくは1個～2個であり、置換で、1個～4個であり、1個～2個が好ましく、より好ましくは1個である。また、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするとは、2つのDNA断片がSambrook Jrによって記載されたような標準的なハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する(Expression of cloned genes in E. coli(Molecular Cloning:A laboratory manual(1989))Cold Spring harbor Laboratory Press, New York, USA, 9. 47-9. 62及び11.45-11.61)。より具体的には、Tm値の±10°Cを基準としてハイブリダイゼーション及び洗浄(例えば約2.0×SSC、50°C)を行うことを意味する。また、前記相同性としては、例えば、90%以上であり、好ましくは95%以上であり、より好ましくは、97. 5%以上である。

[0028] 前記DNAプローブとハイブリダイゼーションさせるターゲットを調製するための遺伝子増幅方法は、検出対象であるバクテリアのITS領域を増幅できる方法であれば特に制限されないが、例えば、PCR法等を用いることができる。本発明におけるDNAプローブはバクテリアのITS領域に由来するため、例えば、少數のプライマーの組合せを用いた1回の遺伝子増幅反応で、全ての検出対象バクテリアからターゲットであるITS領域を増幅できる。

[0029] 例えば、前記A～QのバクテリアのITS領域は、例えば、センスプライマーとして配

列番号116の塩基配列からなるポリヌクレオチドを使用し、アンチセンスプライマーとして配列番号117の塩基配列からなるポリヌクレオチドを使用して増幅させることができる。さらに、前記バクテリアRのITS領域を同時に増幅させる場合は、反応溶液に、アンチセンスプライマーとして、さらに、配列番号118の塩基配列からなるポリヌクレオチドを加えればよい。

[0030] 前述のように増幅されたターゲットと、前記DNAプローブとをハイブリダイズさせて検出する方法としては、特に制限されないが、例えば、サザンプロット、DNAアレイ、DNAマイクロアレイ、DNAチップ等、従来公知の遺伝子検出技術を利用できる。これらのなかでも、検出対象バクテリアに対応するDNAプローブを固定したものであれば、一度に全ての環境試料中のバクテリアを検出できるため好ましい。前記ターゲット及びDNAプローブは、前記検出方法に応じて、適宜標識することが好ましい。例えば、前記ターゲットを調製するための遺伝子増幅時に、同時に、前記ターゲットを標識してもよい。前記標識としては、特に制限されず、例えば、蛍光標識やRI標識を利

用できる。

[0031] 本発明の生物活性判定の対象となる環境としては、特に制限されず、例えば、PCE及びTCEの少なくとも一方で汚染された土壌、地下水、池、海水等があげられる。前記環境の試料から、前記ターゲットの鑄型となる核酸を抽出する方法は、特に制限されず、従来公知の方法で行うことができ、例えば、市販の核酸抽出キットを用いることができる。前記核酸は、例えば、DNAでもよく、RNAでもよい。

[0032] 本発明のバイオレメディエーションの方法は、PCE及びTCEの少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境のバイオレメディエーションの方法であって、本発明の環境の生物活性判定方法を行う工程と、前記方法により前記有機塩素化合物分解関連バクテリアが検出された場合に、前記バクテリアの増殖及び活性の少なくとも一方を促進して前記有機塩素化合物又はその脱塩素化物の分解を促進する工程とを含む方法である。バイオレメディエーションにあたり、予め本発明の生物活性判定方法により環境のPCE等の有機塩素化合物の分解除去能力を把握することで、より的確かつ迅速なバイオレメディエーションの方法の選択が可能となる。例えば、バクテリアRが検出されれば、前記バクテリアRでPCEをエテンにできるから、前記バク

リアRの増殖や活性を高める栄養素を環境に導入するバイオステイミュレーションを選択できる。また、例えば、バクテリアKとCとが検出された場合も、前記2種のバクテリアでPCEを二酸化炭素に分解できるから(図5B参照)、前記2種のバクテリアの増殖や活性を高める栄養素を環境に導入するバイオステイミュレーションが選択できる。

[0033] 本発明のバイオレメディエーションの方法は、その他の態様として、PCE及びTCEの少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境のバイオレメディエーションの方法であって、本発明の環境の生物活性判定方法を行う工程と、前記有機塩素化合物分解関連バクテリアのうち検出されなかったバクテリアの少なくとも一種を前記環境に加えて前記有機塩素化合物又はその脱塩素化物の分解を促進する工程とを含む方法である。例えば、バクテリアKのみが検出された場合、バクテリアCを前記環境に加えることにより、PCEを二酸化炭素に分解することができる。

[0034] 本発明のバクテリアの検出装置は、本発明の生物活性判定方法で使用できる検出装置であって、本発明のDNAプローブを含む装置である。本発明の検出装置は、固定化された前記DNAプローブを含み、前記DNAプローブとハイブリダイズした前記ターゲットを検出できる装置であれば、特に制限されない。本発明の検出装置においては、前記DNAプローブを、少なくとも2つ以上含み、少なくとも2種類以上の前記バクテリアを同時に検出できる検出装置であることが好ましい。さらに好ましくは、配列番号19～115の塩基配列を含むポリヌクレオチドをDNAプローブとして含み、前記A～Rの全てのバクテリアを同時に検出できる装置である。

[0035] 本発明のDNAマイクロアレイは、本発明の生物活性判定方法に使用できるDNAマイクロアレイであって、本発明のDNAプローブが少なくとも1つ基板上に固定されたものである。本発明のDNAマイクロアレイは、2種類以上の本発明のDNAプローブが固定され、2種以上の前記バクテリアが検出できるDNAマイクロアレイであることが、好ましい。本発明のDNAマイクロアレイに固定するDNAプローブは、ノイズを抑えるため長さが短いほうが好ましく、また、Tm値を一定にすることでクロスハイブリを抑制するためにそれぞれの長さをそろえることが好ましい。本発明のDNAマイクロアレイの前記基板としては、特に制限されず、市販のDNAマイクロアレイ用基板等が使用でき、前記基板上へのDNAプローブの固定方法は、特に制限されず、従来公

知の方法を適用できる。

[0036] 本発明の検出キットは、本発明の生物活性判定方法に使用できるバクテリアを検出するためのキットであって、本発明のDNAプローブと、前記DNAプローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマー及び遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キットである。本発明のキットは、その他の態様として、本発明のDNAプローブに代えて、本発明のDNAマイクロアレイを含むキットである。前記遺伝子増幅用プライマーとしては、例えば、センスプライマーとして配列番号116の塩基配列を含むポリヌクレオチドがあげられ、アンチセンスプライマーとしては、配列番号117及び/又は118を含むポリヌクレオチドがあげられる。前記遺伝子増幅用試薬としては、従来公知の試薬が利用でき、例えば、バッファー、ポリメラーゼ、ヌクレオチド等があげられる。本発明の検出キットは、必要に応じて、ターゲット調製用の核酸抽出用試薬及びフィルター若しくはチップ等を含んでいてよい。

[0037] 本発明のポリヌクレオチドは、本発明の生物活性判定方法において前記A～Qのバクテリアを検出するDNAプローブとして使用可能な新規なポリヌクレオチドであって、下記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドである。なお、欠失、置換もしくは付加される塩基の個数、ストリンジエントな条件及び相同性は、前述の定義と同様である。

(1)配列番号1～17及び19～105のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。
。

(2)前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3)前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(4)前記(1)～(3)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌ

クレオチド。

[0038] 以下に、本発明の実施例について説明する。

実施例 1

[0039] (18種類のバクテリアを同時に検出可能なDNAプローブ及びDNAマイクロアレイの作製)

1. DNAプローブの作製

前記AーRのバクテリアのITS配列(それぞれ、配列番号1ー18)から、40塩基からなる塩基配列をデザインし、DNAマイクロアレイのDNAプローブとした。前記DNAプローブのデザインは、40塩基、GC含有量48-50%の一本鎖であり、相補性が無いか又はほとんどなく、国際データベースGenBankでヒットがない(あっても2以上のミスペア)ことを基準として行った。以下に、作製したDNAプローブ(各バクテリアにつきそれぞれ3ー10種類)と、その塩基配列の配列番号(配列番号19ー115)とを示す。

[0040] バクテリアAのプローブA1からA7が、それぞれ、配列番号19から25の塩基配列であり、バクテリアBのプローブB1からB5が、それぞれ、配列番号26から30の塩基配列であり、バクテリアCのプローブC1からC5が、それぞれ、配列番号31から35の塩基配列であり、バクテリアDのプローブD1からD5が、それぞれ、配列番号36から40の塩基配列であり、バクテリアEのプローブE1からE5が、それぞれ、配列番号41から45の塩基配列であり、バクテリアFのプローブF1からF3が、それぞれ、配列番号46から48の塩基配列であり、バクテリアGのプローブG1からG5が、それぞれ、配列番号49から53の塩基配列であり、バクテリアHのプローブH1からH4が、それぞれ、配列番号54から57の塩基配列であり、バクテリアIのプローブI1からI5が、それぞれ、配列番号58から62の塩基配列であり、バクテリアJのプローブJ1からJ6が、それぞれ、配列番号63から68の塩基配列であり、バクテリアKのプローブK1からK6が、それぞれ、配列番号69から74の塩基配列であり、バクテリアLのプローブL1からL5が、それぞれ、配列番号75から79の塩基配列であり、バクテリアMのプローブM1からM7が、それぞれ、配列番号80から86の塩基配列であり、バクテリアNのプローブN1からN5が、それぞれ、配列番号87から91の塩基配列であり、バクテリアOのプローブ

プローブP1からP3が、それぞれ、配列番号92から96の塩基配列であり、バクテリアPのプローブP1からP3が、それぞれ、配列番号97から99の塩基配列であり、バクテリアQのプローブQ1からQ6が、それぞれ、配列番号100から105の塩基配列であり、バクテリアRのプローブR1からR10が、それぞれ、配列番号106から115の塩基配列である。

[0041] 2. DNAマイクロアレイの作製とDNAプローブの特異性の確認

次に、前記97種類のDNAプローブを、Affymetrix 417 Arrayer (Affymetrix社製)により、Takara Hubble Slide (Takara社製)にカスタムプリントし、DNAマイクロアレイを作製した。そして、ターゲットを前記AからRのバクテリアからそれぞれ調製し、そのターゲットを前記DNAマイクロアレイとハイブリダイズすることで、DNAプローブの特異性を確認した。

[0042] 前記ターゲットは、前記バクテリアのITS領域をPCR法で増幅して調製した。前記PCRにおいて、センスプライマーとして配列番号116の塩基配列からなる非標識プライマーを使用し、アンチセンスプライマーとして前記バクテリアR以外には配列番号117の塩基配列からなるCy3標識プライマーを使用し、前記バクテリアRには配列番号118の塩基配列からなるCy3標識プライマーを使用した。PCRの反応条件は、標準的なプロトコールに従った。

[0043] ターゲットとなる前記PCRの増幅産物を、Autoseq G-50(ファルマシア社製)を用いて脱塩し、SpeedVac (Savant社製)を用いて吸引乾燥し、最終濃度が5×SSC、0.2%SDS、50%ホルムアミドであるバッファーに溶解させた。前記ターゲット溶解液を、94°Cで3分間ボイルして少なくとも2分間氷冷した後、前記DNAマイクロアレイ上にアプライした。カバーグラスを前記DNAマイクロアレイ上にかぶせ、その後、42°Cに設定されたハイブリダイゼーションチャンバー内に少なくとも4時間配置した後、前記DNAマイクロアレイを、0.2×SSC、0.2%SDSで5分間、0.2×SSCで5分間、そして、0.05×SSCで数秒間洗浄し、1,800rpmでスピンドライした。結果の測定は、Scanarry version 5(パーキンエルマージャパン社製)でスキャンして行った。

[0044] その結果をまとめたものを図1に示す。図1は、縦軸に示された18種類の前記A～RのバクテリアのITS配列由来のターゲットと横軸に示す97のDNAプローブとがハイ

ブリダイズしたかどうかを示すグラフである。同図において、黒塗りの部分が、500蛍光ユニット以上のシグナルを示してDNAプローブとターゲットがハイブリダイズしたことを示す。なお、横軸の系統樹は、ITS配列のアライメントから作製したものである。図1に示すとおり、前記AからRのバクテリアそれぞれから調製したターゲットは、クロスハイブリダイズすることなく、前記AからRのバクテリアのDNAプローブのみと有意にハイブリダイズすることが示された。

実施例 2

[0045] (汚染環境の生物活性判定1)

松下空調環境エンジニアリング株式会社の提供による土壌試料の250mgから、FastPrep bead-beater and soil DNA extraction kit (Q Biogene社製)を用い、取扱い説明書に従って、DNAを抽出した。前記DNAの約 $1\ \mu l$ を、非標識センスプライマー27F(配列番号116)とCy3標識アンチセンスプライマー132R(配列番号117)又は341R(配列番号118)とを含む $50\ \mu l$ の standard AmpliTaq Gold PCR 混合液(アプライドバイオシステムズ社製)に添加した。PCRを標準的なプロトコールにより行った後、PCR増幅産物を Autoseq G-50(ファルマシア社製)を用いて脱塩し、SpeedVac(Savant社製)を用いて吸引乾燥した。乾燥した前記PCR増幅産物を、最終濃度が $5\times SSC$ 、0.2%SDS、50%ホルムアミドであるバッファーに溶解させ、その溶解液を、94°Cで3分間ボイルして少なくとも2分間氷冷した後、実施例1で作製したDNAマイクロアレイ上にアプライした。カバーグラスを前記マイクロアレイ上にかぶせ、42°Cで設定されたハイブリダイゼーションチャンバー内に少なくとも4時間配置した後、前記DNAマイクロアレイを、 $0.2\times SSC$ 、0.2%SDSで5分間、 $0.2\times SSC$ で5分間、そして、 $0.05\times SSC$ で数秒間洗浄し、1,800rpmでスピンドライした。結果の測定は、DNAマイクロアレイを Scanarray version 5(パーキンエルマージャパン社製)でスキャンして行った。

[0046]

前記DNAマイクロアレイをスキャンした結果の一部を図2に示す。図2Aは、スキャニイメージを示し、図2Bは、定量化した結果のグラフを示す。図2に示すとおり、バクテリアM(Dehalobacter restrictus DSM 945)のプローブに対する有意なハイブリダイズが検出された。従って、前記試料の土壌には、PCEをcisDCEに分解する能力が

あると判定できた(図5B参照)。

実施例 3

[0047] (汚染環境の生物活性判定2)

前記土壤試料の代わりに、松下空調環境エンジニアリング株式会社の提供による300mlの地下水試料を使用し、7,000rpmで遠心分離したデブリからDNAを抽出したほかは、実施例2と同様にして、前記地下水試料中のバクテリアを前記DNAマイクロアレイを用いて検出した。

[0048] その結果の一部を図3に示す。図3Aは、スキャンイメージを示し、図3Bは、定量化した結果のグラフを示す。図3に示すとおり、バクテリアJ (*Clostridium formicoaceticum* ATCC 27076) のプローブに対する有意なハイブリダイズが検出された。従って、前記試料の土壤には、PCEをTCEに分解する能力があると判定できた(図5B参照)。

実施例 4

[0049] (汚染環境の生物活性判定3)

前記土壤試料の代わりに、T.H. Lee博士(韓国)の提供による嫌気的集積培養試料を用いた他は、実施例2と同様にして、前記試料中の前記バクテリアを検出した。

[0050] その結果を図4に示す。図4に示すとおり、バクテリアA、J、M、N及びOの一部のプローブに強いシグナルが検出され、バクテリアB及びIのプローブからも弱いシグナルが検出された。したがって、前記試料には、PCEをcisDCEに変換する能力があると判定できた(図5B参照)。この判定結果は、T.H. Lee博士による前記集積培養のPCE/cisDCEの分析データと一致する内容であった。

産業上の利用可能性

[0051] 以上、説明したとおり、本発明の環境の生物活性判定方法及び本発明のポリヌクレオチドは、PCE等の汚染環境の修復方法、とりわけ、バイオレメディエーションの分野で有用である。

配列表フリーテキスト

[0052] 配列番号116 PCR用センスプライマー27F

配列番号117 PCR用アンチセンスプライマー132R

配列番号118 PCR用アンチセンスプライマー341R

請求の範囲

[1] テトラクロロエチレン(PCE)及びトリクロロエチレン(TCE)の少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境の生物活性判定方法であって、
環境試料から抽出した核酸を遺伝子増幅方法により増幅してターゲットとし、
前記ターゲットを前記有機塩素化合物分解関連バクテリアに特有の塩基配列を含むDNAプローブとハイブリダイズさせることで前記環境中の前記バクテリアを検出し、
検出された前記バクテリアの前記有機塩素化合物及びその脱塩素化物に対する分解能力に基づき、前記環境の前記有機塩素化合物の除去能力を判定する生物活性判定方法であり、
前記DNAプローブが、下記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブを含み、
前記有機塩素化合物分解関連バクテリアが、下記AからRからなる群から選択される少なくとも1種を含む嫌気性バクテリアである生物活性判定方法。
(1)配列番号1～17及び配列番号19～105のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。
(2)前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジメントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。
(3)前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。
(4)前記(1)～(3)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

A:デハロスピリルム マルチヴォボランス (Dehalospirillum multivorans)
B:デスルフィトバクテリウム フラピエリ (Desulfitobacterium frappieri)
C:アクチノマイセタレス Sm-1(ロドコッカス sp. Sm-1) (Actinomycetales Sm-1)

(Rhodococcus sp. Sm-1))

D:ロドコッカス ロドコッカス(Rhodococcus rhodococcus)

E:キサントバクター フラバス(Xanthobacter flavus)

F:マイコバクテリウム L1 (Mycobacterium L1)

G:デスルフォミクロビウム ノルベギカム(デスルフォヴィブリオ バキュラタス)(

Desulfomicrobium norvegicum (Desulfovibrio baculatus))

H:デスルフィトバクテリウム デハロゲナンス(Desulfitobacterium dehalogenans)

I:デスルフィトバクテリウム ハフニエンス(Desulfitobacterium hafniense)

J:クロストリジウム フォルミコアセチカム(Clostridium formicoaceticum)

K:デスルフロノナス クロロエテニカ(Desulfuromonas chloroethenica)

L:アセトバクテリウム ウッディ DSM 1030 (Acetobacterium woodii DSM 1030)

M:デハロバクター レストリクタス(Dehalobacter restrictus)

N:デスルフィトバクテリウム sp. PCE1 (Desulfitobacterium sp. strain PCE1)

O:デスルフィトバクテリウム フラピエリ TCE1 (Desulfitobacterium frappieri TCE1)

P:アセトバクテリウム ウッディ DSM 2396 (Acetobacterium woodii DSM 2396)

Q:デスルフォモニル タイドジェイ DCB-1 (Desulfomonile tiedjei DCB-1)

R:デハロコッコイデス エタノジエネス195 (Dehalococcoides ethenogenes 195)

[2] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
核酸の遺伝子增幅方法に用いるセンスプライマーが、配列番号116の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むプライマーであり、アンチセンスプライマーが、配列番号117及び/又は118の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むプライマーである生物活性判定方法。

[3] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記汚染された環境が、土壤、地下水、池及び海水からなる群から選択される環境である生物活性判定方法。

[4] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアAを検出するためのDNAプローブが、配列番号1及び配列番号19

～25のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。

- [5] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアBを検出するためのDNAプローブが、配列番号2及び配列番号26～30のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [6] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアCを検出するためのDNAプローブが、配列番号3及び配列番号31～35のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [7] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアDを検出するためのDNAプローブが、配列番号4及び配列番号36～40のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [8] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアEを検出するためのDNAプローブが、配列番号5及び配列番号41～45のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [9] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアFを検出するためのDNAプローブが、配列番号6及び配列番号46～48のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [10] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアGを検出するためのDNAプローブが、配列番号7及び配列番号49～53のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [11] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアHを検出するためのDNAプローブが、配列番号8及び配列番号54

～57のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。

- [12] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアIを検出するためのDNAプローブが、配列番号9及び配列番号58～62のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [13] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアJを検出するためのDNAプローブが、配列番号10及び配列番号63～68のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [14] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアKを検出するためのDNAプローブが、配列番号11及び配列番号69～74のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [15] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアLを検出するためのDNAプローブが、配列番号12及び配列番号75～79のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [16] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアMを検出するためのDNAプローブが、配列番号13及び配列番号80～86のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [17] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアNを検出するためのDNAプローブが、配列番号14及び配列番号87～91のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [18] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアOを検出するためのDNAプローブが、配列番号15及び配列番号9

2～96のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。

- [19] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアPを検出するためのDNAプローブが、配列番号16及び配列番号97～99のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [20] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記バクテリアQを検出するためのDNAプローブが、配列番号17及び配列番号100～105のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブである生物活性判定方法。
- [21] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記J、L及びPの少なくとも1種のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCEをTCEに分解する能力を有すると判定する生物活性判定方法。
- [22] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記A、G及びMの少なくとも1種のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCEをシス型ジクロロエチレン(cisDCE)に分解する能力を有すると判定する生物活性判定方法。
- [23] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記B、I、H、N、O及びQの少なくとも1種のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCE及びTCEをcisDCEに分解する能力を有すると判定する生物活性判定方法。
- [24] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記Kのバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCE及びTCEをDCEに分解する能力を有すると判定する生物活性判定方法。
- [25] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記Rのバクテリアが検出された場合に、前記環境が、PCE、TCE、DCE及びビニルクロライド(VC)をエテンに分解する能力を有すると判定する生物活性判定方法。
。

[26] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記C、D及びEの少なくとも1種のバクテリアが検出された場合に、前記環境が、D
CE及びVCを二酸化炭素に分解する能力を有すると判定する生物活性判定方法。

[27] 請求項1に記載の生物活性判定方法であって、
前記Fのバクテリアが検出された場合に、前記環境が、VCを二酸化炭素に分解す
る能力を有すると判定する生物活性判定方法。

[28] PCE及びTCEの少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境のバイオレ
メディエーションの方法であって、
請求項1に記載の方法により前記環境の生物活性の判定を行う工程と、
前記有機塩素化合物分解関連バクテリアが検出された場合に、前記バクテリアの増
殖及び活性の少なくとも一方を促進して前記有機塩素化合物又はその脱塩素化物
の分解を促進する工程とを含むバイオレメディエーションの方法。

[29] PCE及びTCEの少なくとも一方の有機塩素化合物で汚染された環境のバイオレ
メディエーションの方法であって、
請求項1に記載の方法により前記環境の生物活性の判定を行う工程と、
前記有機塩素化合物分解関連バクテリアのうち検出されなかったバクテリアの少なく
とも一種を前記環境に加えて前記有機塩素化合物又はその脱塩素化物の分解を促
進する工程とを含むバイオレメディエーションの方法。

[30] 請求項1に記載の生物活性判定方法に用いる前記バクテリアの検出装置であって
、前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドをDNAプローブとして含む検出装置
。

[31] 前記DNAプローブを、少なくとも2つ以上含み、少なくとも2種類以上の前記バクテ
リアを同時に検出できる請求項30に記載の検出装置。

[32] 請求項1に記載の生物活性判定方法に用いるDNAマイクロアレイであって、前記(1)
～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブが、基板上に固定され
たDNAマイクロアレイ。

[33] 前記DNAプローブが、少なくとも2つ以上固定され、少なくとも2種類以上の前記
バクテリアを同時に検出できる請求項32に記載のDNAマイクロアレイ。

[34] 請求項1に記載の生物活性判定方法に用いる前記バクテリアを検出するためのキットであって、前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含むDNAプローブと、前記DNAプローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマー及び遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キット。

[35] 請求項1に記載の生物活性判定方法に用いる前記バクテリアを検出するためのキットであって、請求項32に記載のDNAマイクロアレイと、前記DNAプローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマー及び遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キット。

[36] 請求項1に記載の生物活性判定方法における核酸の遺伝子増幅方法に用いるセンスプライマーであって、配列番号116の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むプライマー。

[37] 請求項1に記載の生物活性判定方法における核酸の遺伝子増幅方法に用いるアンチセンスプライマーであって、配列番号117又は118の塩基配列からなるポリヌクレオチドを含むプライマー。

[38] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号1及び配列番号19～25のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアAを検出するためのDNAプローブ。

[39] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号2及び配列番号26～30のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアBを検出するためのDNAプローブ。

[40] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号3及び配列番号31～35のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアCを検出するためのDNAプローブ。

[41] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号4及び配列番号36～40のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアDを検出するためのDNAプローブ。

[42] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号5及び配列番号41～45のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれか

のポリヌクレオチドを含む前記バクテリアEを検出するためのDNAプローブ。

[43] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号6及び配列番号46～48のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアFを検出するためのDNAプローブ。

[44] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号7及び配列番号49～53のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアGを検出するためのDNAプローブ。

[45] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号8及び配列番号54～57のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアHを検出するためのDNAプローブ。

[46] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号9及び配列番号58～62のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアIを検出するためのDNAプローブ。

[47] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号10及び配列番号63～68のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアJを検出するためのDNAプローブ。

[48] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号11及び配列番号69～74のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアKを検出するためのDNAプローブ。

[49] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号12及び配列番号75～79のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアLを検出するためのDNAプローブ。

[50] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号13及び配列番号80～86のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアMを検出するためのDNAプローブ。

[51] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号14及び配列番号87～91のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアNを検出するためのDNAプローブ。

[52] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号15及び配列番号92～96のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアOを検出するためのDNAプローブ。

[53] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号16及び配列番号97～99のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアPを検出するためのDNAプローブ。

[54] 請求項1に記載の生物活性判定方法に使用可能なDNAプローブであって、配列番号17及び配列番号100～105のいずれかに対応する前記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチドを含む前記バクテリアQを検出するためのDNAプローブ。

[55] 請求項1に記載の生物活性判定方法における有機塩素化合物分解関連バクテリアを検出するためのDNAプローブとして使用可能なポリヌクレオチドであって、下記(1)～(4)のいずれかのポリヌクレオチド。

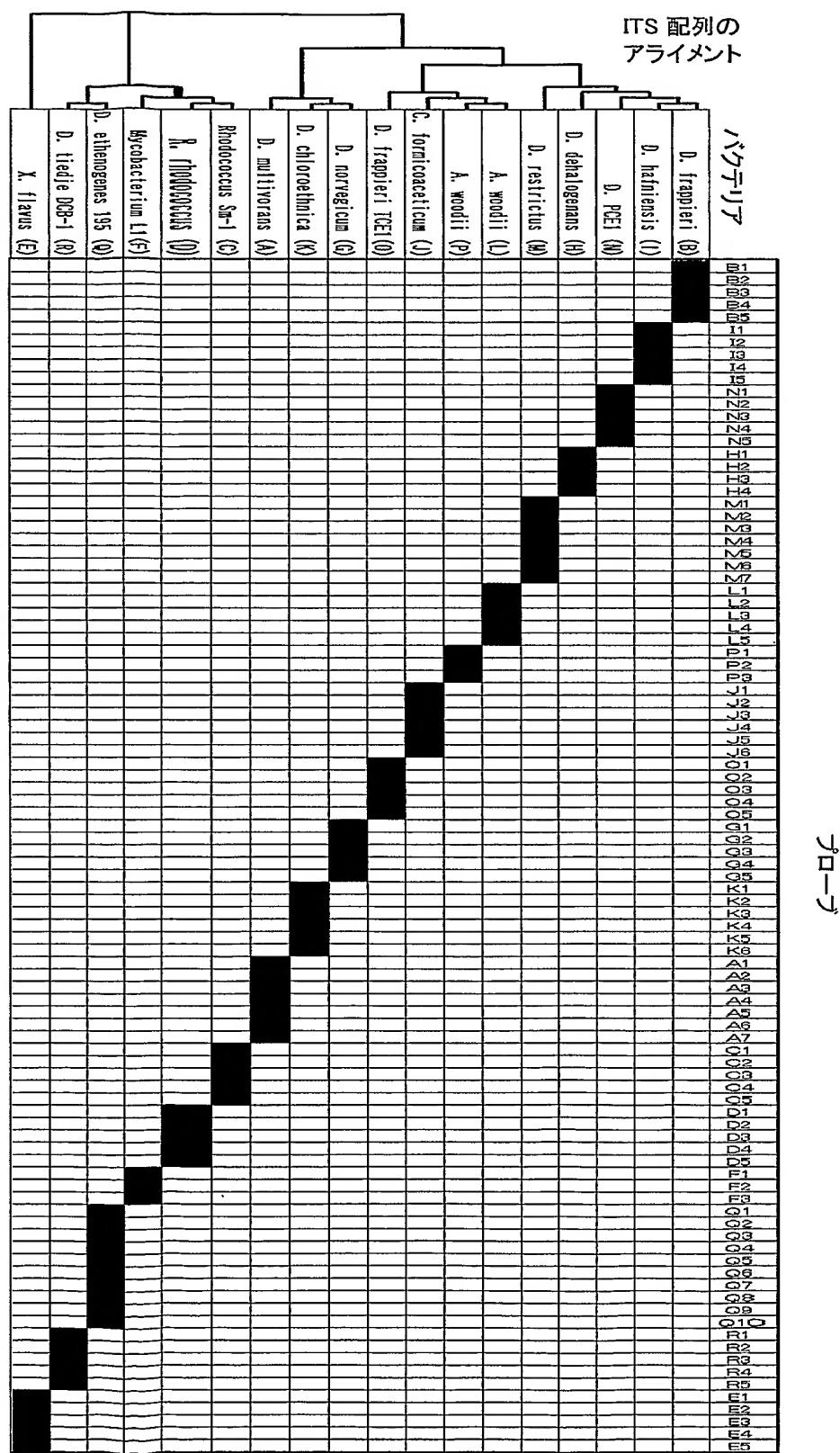
(1)配列番号1～17及び19～105のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。
。

(2)前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

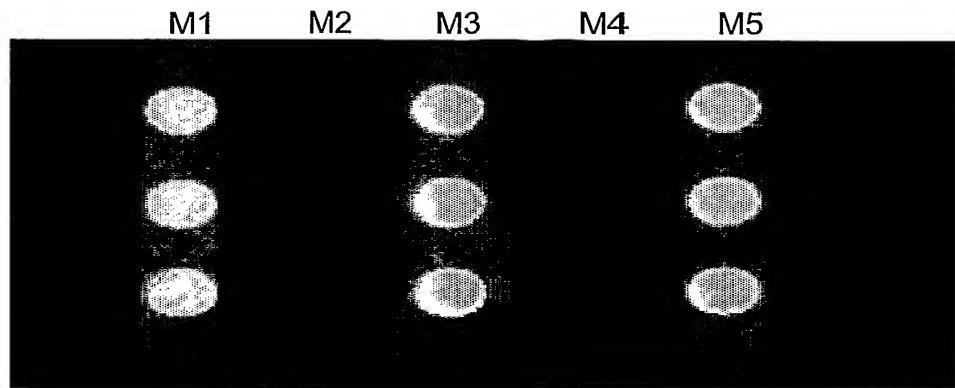
(3)前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(4)前記(1)～(3)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

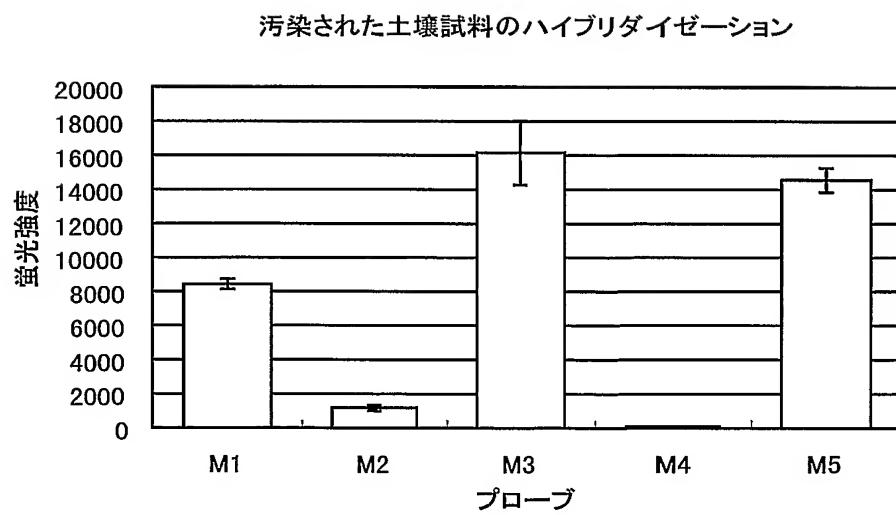
【図1】



【図2A】

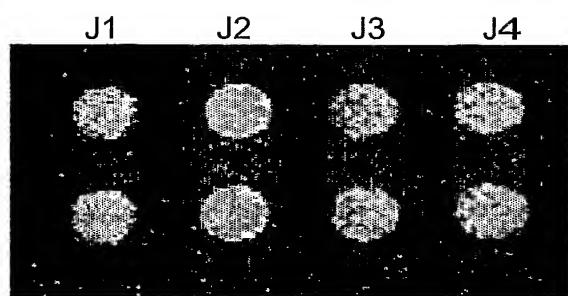


【図2B】

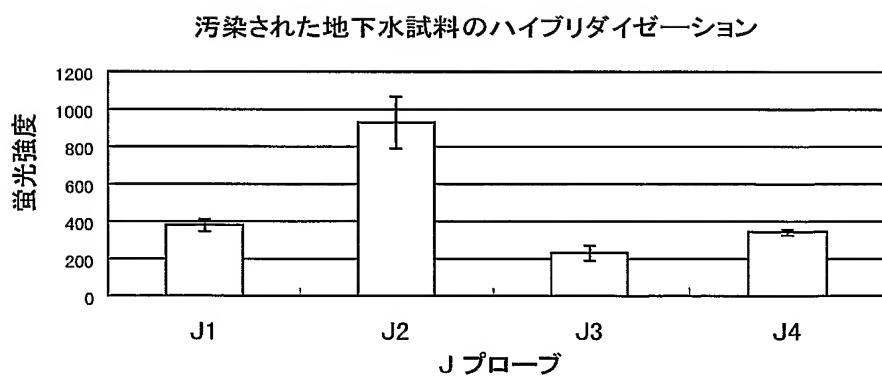


差替え用紙(規則26)

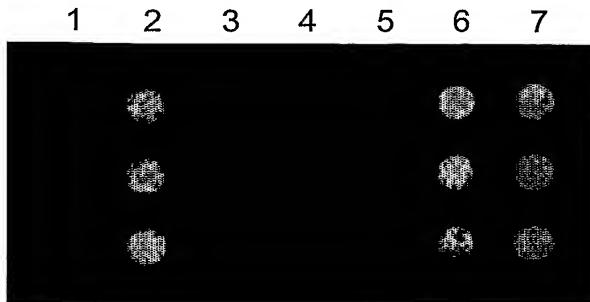
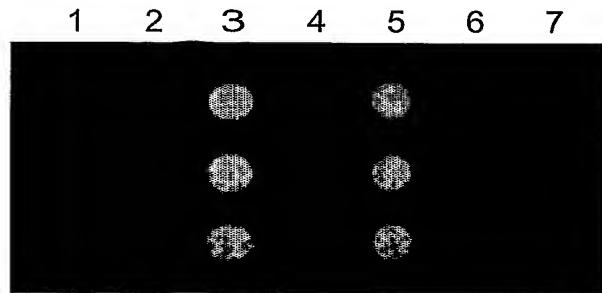
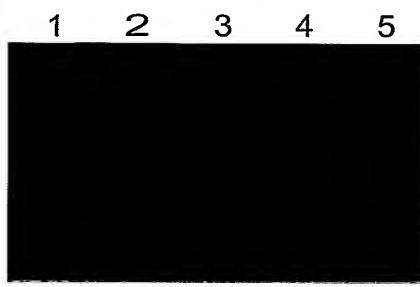
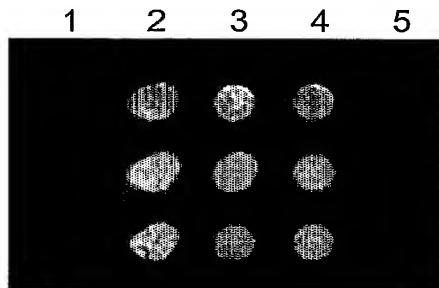
【図3A】



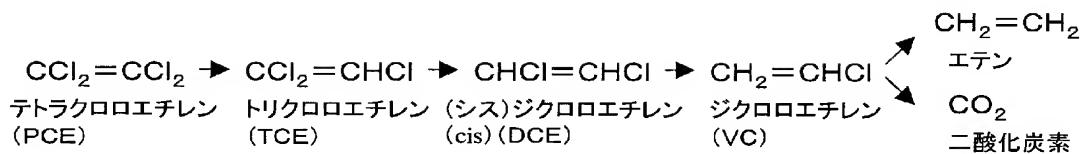
【図3B】



【図4】

A プローブ (*Dehalospirillum multivorans*)M プローブ (*Dehalobacter restrictus*)B プローブ (*Desulfitobacterium frappieri*)N プローブ (*Desulfitobacterium PCE1*)I プローブ (*Desulfitobacterium hafniense*)O プローブ (*Desulfitobacterium frappieri TCE1*)J プローブ (*Clostridium formicoaceticum*)

[図5A]



[図5B]

<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195 R	PCE → TCE → DCE → VC → ethene
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> B	PCE → TCE → cisDCE
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> I	
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> H	
<i>Desulfitobacterium</i> sp. strain PCE1 N	
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> TCE1 O	
<i>Desulfomonile tiedjei</i> DCB-1 Q	
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i> K	PCE → TCE → DCE
<i>Acetobacterium woodii</i> L	PCE → TCE
<i>Acetobacterium woodii</i> P	
<i>Clostridium formicoaceticum</i> J	PCE → TCE
<i>Dehalobacter restrictus</i> M	PCE → cisDCE
<i>Dehalospirillum multivorans</i> A	PCE → cisDCE
<i>Desulfomicrobium norvegicum</i> G	PCE → cisDCE
<i>Rhodococcus</i> sp. Sm-1 C	DEC, VC → CO ₂
<i>Rhodococcus rhodococcus</i> D	
<i>Xanthobacter flavus</i> E	DCE, VC → CO ₂
<i>Mycobacterium</i> L1 F	VC → CO ₂

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12N15/00, B09C1/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12M1/00, C12N15/00, B09C1/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CAPLus (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP 2004-290171 A (Akira HIRAI SHI), 21 October, 2004 (21.10.04), Full descriptions (Family: none)	1-55
Y	JP 2003-38199 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 12 February, 2003 (12.02.03), Claims; Par. Nos. [0036], [0052]; examples & US 2002/0150887 A1	1-55
Y	Y.C. CHANG et al., "PCE Bunkai Biseibutsu ni Kansuru Kenkyu no Genjo (Zenpen)", Environmental Conservation Engineering, 2000, Vol.29, No.8, pages 642 to 649	1-55

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 March, 2005 (15.03.05)

Date of mailing of the international search report
05 April, 2005 (05.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003175

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Y.C. CHANG et al., "PCE Bunkai Biseibutsu ni Kansuru Kenkyu no Genjo (Kohen)", Environmental Conservation Engineering, 2000, Vol.29, No.9, pages 725 to 730	1-55
Y	KUWAHARA T, et al., "Genetic variation in 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions and the possible use of this genetic variation for molecular diagnosis of Bacteroides species.", Microbiol.Immunol., 2001, Vol.45, No.3, p.191-9	1-55
Y	SELVARANGEN R, et al., "Rapid identification of commonly encountered Cadida species directly from blood culture bottles.", J.Clin.Microbiol., 2003, Vol.41, No.12, p.5660-4	1-55
Y	FROTHINGHAM R, et al., "Sequence-based differentiation of strains in the Mycobacterium avium complex.", J.Bacteriol., 1993, Vol.175, No.10, p.2818-25	1-55
Y	JP 2000-79000 A (Showa Shell Sekiyu Kabushiki Kaisha), 21 March, 2000 (21.03.00), Par. Nos. [0009], [0013] (Family: none)	28,29
Y	JP 2000-253886 A (Taisei Corp.), 19 September, 2000 (19.09.00), Claims (Family: none)	30-33

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. 7 C12Q1/68, C12M1/00, C12N15/00, B09C1/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. 7 C12Q1/68, C12M1/00, C12N15/00, B09C1/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPlus(STN) MEDLINE(STN) BIOSIS(STN) WPI/IDS(STN) JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	JP 2004-290171 A(平石明) 2004.10.21, 明細書全部(ファミリーなし)	1-55
Y	JP 2003-38199 A(独立行政法人産業技術総合研究所) 2003.02.12, 特許請求の範囲, 【0036】 , 【0052】段落, 実施例 & US 2002/0150887 A1	1-55
Y	Y. C. CHANG 他, "PCE分解微生物に関する研究の現状(前編)" 環境技術, 2000, Vol. 29, No. 8, p. 642-649	1-55
Y	Y. C. CHANG 他, "PCE分解微生物に関する研究の現状(後編)" 環境技術, 2000, Vol. 29, No. 9, p. 725-730	1-55

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 03. 2005

国際調査報告の発送日

05. 4. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

田中 晴絵

4 N 9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	KUWAHARA T, et. al., "Genetic variation in 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions and the possible use of this genetic variation for molecular diagnosis of <i>Bacteroides</i> species." <i>Microbiol Immunol.</i> , 2001, Vol. 45, No. 3, p. 191-9.	1-55
Y	SELVARANGAN R, et. al., "Rapid identification of commonly encountered <i>Candida</i> species directly from blood culture bottles." <i>J Clin Microbiol.</i> , 2003, Vol. 41, No. 12, p. 5660-4.	1-55
Y	FROTHINGHAM R, et. al., "Sequence-based differentiation of strains in the <i>Mycobacterium avium</i> complex." <i>J Bacteriol.</i> , 1993, Vol. 175, No. 10, p. 2818-25.	1-55
Y	JP 2000-79000 A(昭和シェル石油株式会社)2000.03.21 , 【0009】 , 【0013】段落 (ファミリーなし)	28, 29
Y	JP 2000-253886 A(大成建設株式会社)2000.09.19, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	30-33